

---

## 4. Ergebnisse

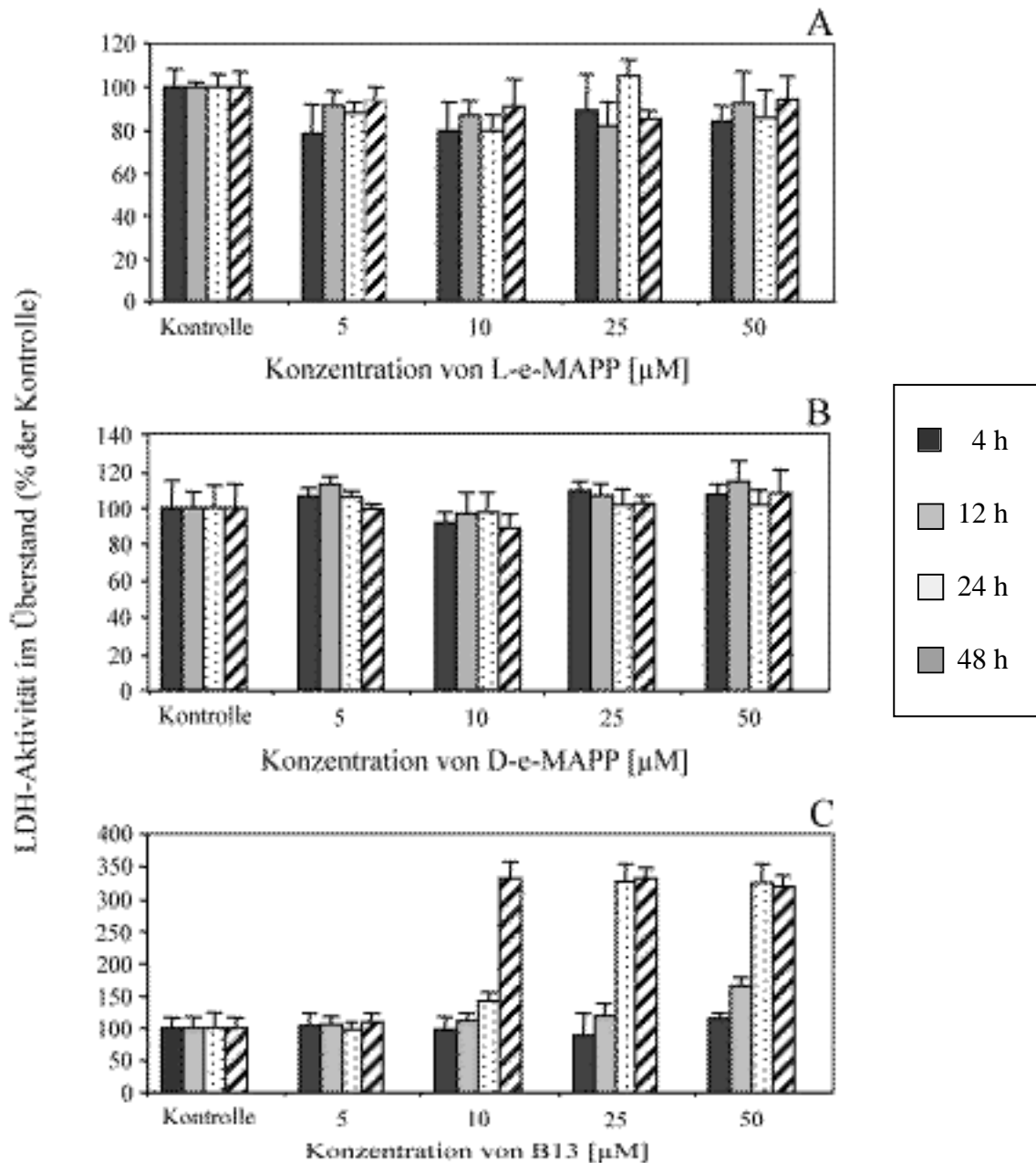
### 4.1. Bestimmung der Zytotoxizität der Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf HaCaT-Keratinocyten

Durch Einwirkung von primär toxischen oder in hohen Dosen toxischen Substanzen kommt es zu einem Verlust der Zellmembranintegrität mit nachfolgender Freisetzung von zytoplasmatischen Enzymen und anderen Bestandteilen. Dieser Vorgang ist wenige Minuten bis zu einigen Stunden nach Einwirkung toxischer Substanzen meßbar. Diese für die Nekrose typische Art von unspezifischer Zellschädigung als die Zellen wahllos lysierender Prozeß soll in dieser Arbeit von dem fein regulierten, auf spezifische Außenreize hin ablaufenden Vorgang der Apoptose zur Eliminierung von einzelnen Zellen unterschieden werden. Während die Apoptose bei krankhaften als auch gesunden Organismen eine Rolle spielt, ist im Gegensatz dazu der Vorgang der Nekrose immer pathologisch und kann nach akuten physikalischen oder chemischen Stress-Momenten, Traumen, Nährstoffmangel oder Anoxie auftreten (Hirsch *et al.*, 1997).

Es wurde in den die Zytotoxizität messenden Experimenten sowohl die optimale Behandlungszeit als auch die optimale Konzentration der eingesetzten Substanzen bestimmt, wobei der möglichst nicht-zytotoxische Bereich einer Substanz definiert werden sollte. Die Zytotoxizität wurde durch eine Farbreaktion mittels der sich im Zellkulturüberstand anreichernden Lactatdehydrogenase (s. Protokoll 3.3.) photometrisch bei 490 nm gemessen. Die LDH-Freisetzung wurde nach 4 h, 12 h, 24 h und 48 h der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 5, 10, 25, 50 µM) der 3 Substanzen bestimmt. Als Positivkontrolle diente 0,01% Triton X-100, welches als Detergenz innerhalb von 10 min zu einer Zellmembranlyse mit starker LDH-Freisetzung führte. Weder L-e-MAPP noch D-e-MAPP zeigten in den gewünschten Behandlungszeiträumen und bis zu einer Konzentration von 50 µM einen zytotoxischen Effekt auf HaCaT-Keratinocyten (Abb. 8 A und B). B13 zeigte in den beiden frühen Phasen der Behandlung (4 h, 12 h) bis zu einer Konzentration von 25 µM keinen signifikanten zytotoxischen Effekt, erst bei 50 µM B13 steigt die Zytotoxizität nach 12 h Behandlungszeit auf etwa 165 % der Kontrolle an. Konzentrationen zwischen 10 µM und 50 µM B13 zeigten in den späteren Zeitpunkten (24 h, 48 h) eine LDH-Erhöhung. So zeigte

10  $\mu\text{M}$  B13 nach 48 h einen LDH-Anstieg auf etwa 330 % der Kontrolle, 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  B13 nach 24 h und 48 h einen LDH-Anstieg ebenfalls auf 330 % der Kontrolle (s. Abb. 8 C). Diese LDH-Freisetzung zu den späteren Zeitpunkten ist jedoch nicht auf primäre Toxizität der Behandlungssubstanz zurückzuführen, sondern unter Zuhilfenahme der Experimente zur Messung der Apoptose als Folge der sog. „Sekundären Nekrose“ zu sehen. Letzere beschreibt den späteren Anstieg der zytoplasmatischen Enzyme nach Entleeren der membranumhüllten apoptotischen Vesikel, der sog. „apoptotic bodies“ *in vitro*, da die *in vivo* aktiven, phagozytierenden Makrophagen fehlen. Alle drei Phenylaminoalkohol-Derivate weisen somit in einer Konzentration von 0-25  $\mu\text{M}$  keinerlei zytotoxische Effekte in den wichtigen kurzen Behandlungszeiträumen auf, nur B13 hat in der höheren Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nach 12 h einen leichten zytotoxischen Effekt.

Wegen der späteren Vergleichbarkeit der Substanzen wurden alle weiteren Versuche mit einer einheitlichen nicht-toxischen Maximalkonzentration der 3 Analoga von 25  $\mu\text{M}$  durchgeführt.



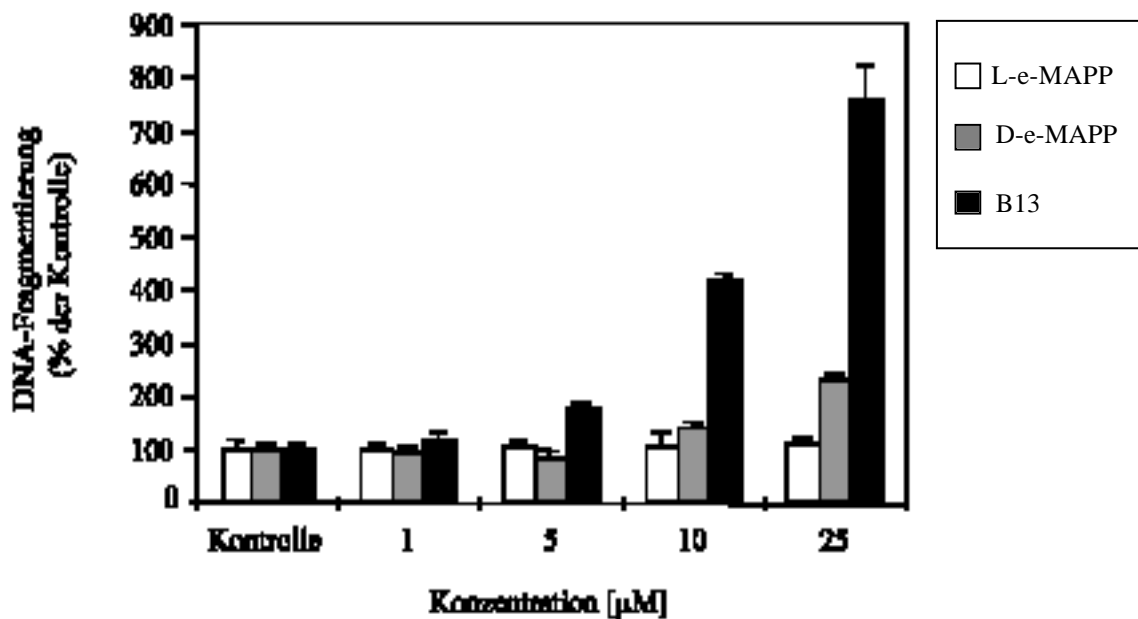
**Abb.8. Messung der Zytotoxizität von L-e-MAPP (A), D-e-MAPP (B) und B13 (C) auf HaCaT-Keratinocyten.**

Präkonfluente HaCaT-Keratinocyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) der drei Substanzen über verschiedene Zeitpunkte behandelt. Die Zytotoxizität wurde unter Verwendung eines Lactat-Dehydrogenase-Aktivitäts-Assays („Cytotoxicity Detection Kit“) der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) wie im Methodenteil beschrieben photometrisch (490 nm) bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$  S.D. (n=4) angegeben.

## 4.2. Apoptotischer Effekt der Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf HaCaT-Keratinocyten

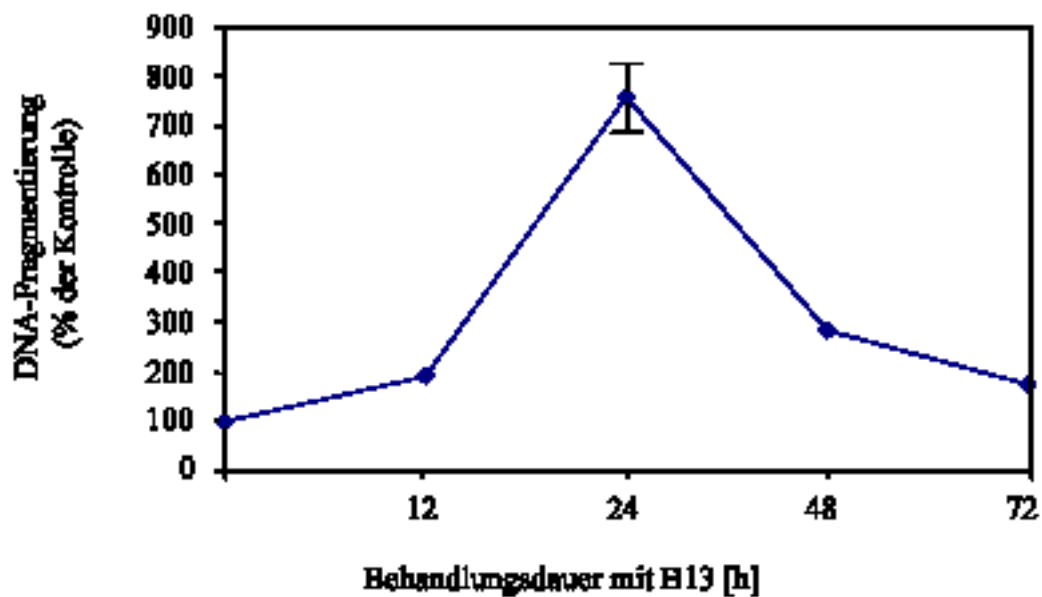
Es wurde die Fähigkeit der drei Phenylaminoalkohol-Derivate untersucht, in HaCaT-Keratinocyten Apoptose auszulösen. Hierzu wurden die für die Apoptose spezifischen 200 bp-DNA-Fragmente im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen, wobei die zelluläre Membranintegrität erhalten bleibt (Duke *et al.*, 1996). Die nachzuweisenden Histongekoppelten DNA-Fragmente bilden einerseits mit einem Biotin-haltigem Antikörper und andererseits mit einem Peroxidase-haltigen Antikörper einen sog. „Sandwich-Komplex“, dessen Peroxidase-Aktivität zur Farbumsetzung eines Indikators führt, welcher photometrisch bei 405 nm gemessen wird (s. Protokoll 3.4.). Dabei wurde die Zeitabhängigkeit (0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) als auch Konzentrationsabhängigkeit (0, 1, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$ ) der Apoptose-Induktion der einzelnen Substanzen genauer betrachtet. Abb. 9 zeigt die zu detektierenden apoptotischen DNA-Fragmente 24 h nach Behandlung mit den gewünschten Derivaten prozentual zur nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Während L-e-MAPP zu allen Zeitpunkten und bei allen Konzentrationen ohne Einfluß auf HaCaT-Zellen blieb, führten sowohl D-e-MAPP als auch B13 zur Apoptose-Induktion, wobei B13 die weitaus größere apoptotische Potenz besitzt. 10  $\mu\text{M}$  D-e-MAPP löste eine Apoptose-Induktion von 140 % im Vergleich zur Kontrolle und 25  $\mu\text{M}$  D-e-MAPP von ca. 230 % im Vergleich zur Kontrolle aus. B13 führte schon bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu 116 %, 5  $\mu\text{M}$  zu 175 %, 10  $\mu\text{M}$  zu 422 % und 25  $\mu\text{M}$  sogar zu 760 % Apoptose-Induktion im Vergleich zur Kontrolle. Apoptotische Effekte nach D-e-MAPP und B13-Behandlung waren auch schon beginnend nach 12 h zu beobachten, wenn auch bei beiden Derivaten in sehr viel geringerem Ausmaß als nach 24 h. Ebenfalls apoptotische Morphologie zeigten die Zellen nach 48 h und 72 h Behandlung mit D-e-MAPP und B13, wobei auch hier weit geringere Werte als nach 24 h zu messen waren. Abb. 10 zeigt den zeitabhängigen Prozeß der Apoptose am Beispiel der B13-Behandlung. Nach 12 h Behandlungsdauer liegt die Anzahl der apoptotischen Zellen bei 194 % gegenüber der Kontrolle, nach 24 h, wie schon beschrieben, bei 760 %, nach 48 h ist eine Apoptose-Rate von 285 % und nach 72 h von 177 % im Vergleich zu den Kontrollzellen vorhanden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß L-e-MAPP keine apoptotische Antwort in HaCaT-Keratinocyten auslöst und D-e-MAPP als auch

B13 zur Apoptose-Induktion führen. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit als auch eine Zeitabhängigkeit des programmierten Zelltodes nach Behandlung mit D-e-MAPP und B13 nachgewiesen werden, wobei der optimalste Zeitpunkt der Apoptose-Detektion nach 24 h und eine nicht-zytotoxische Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  als optimale Apoptose-induzierende Konzentration zu beobachten waren.



**Abb.9. Konzentrationsabhängiger apoptotischer Effekt von L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf HaCaT-Keratinocyten.**

Präkonfluente HaCaT-Keratinocyten wurden über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$ ) der drei Substanzen behandelt. Wie im Methodenteil näher erläutert, wurde die apoptotische DNA-Fragmentation mittels eines „Cell Death Detection Elisa<sup>Plus</sup>“ der Fima Roche Diagnostics (Mannheim, D) zur Detektion von zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten photometrisch (405 nm) bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$  S.D. (n=4) angegeben.

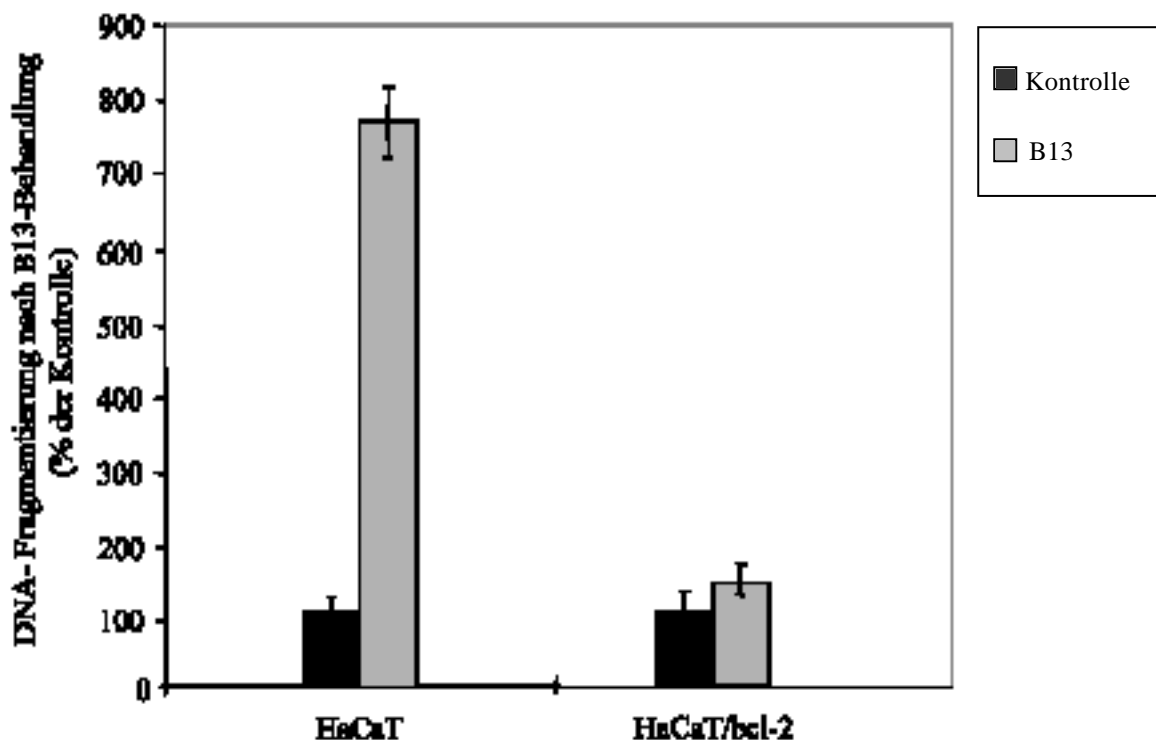


**Abb.10. Zeitabhängiger apoptotischer Effekt von B13 auf HaCaT-Keratinocyten.**

Präkonfluente HaCaT-Keratinocyten wurden mit 25  $\mu$ M B13 über verschiedene Zeiträume (12 h, 24 h, 48 h, 72 h) behandelt. Wie im Methodenteil näher erläutert, wurde die apoptotische DNA-Fragmentation mittels eines „Cell Death Detection Elisa<sup>Plus</sup>“ zur Detektion von zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten photometrisch (405 nm) bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$ S.D. (n=4) angegeben. Die Standardabweichung ist teilweise vom Symbol verdeckt.

### 4.3. Einfluß von bcl-2 auf die Phenylaminoalkohol-induzierte Apoptose

Es konnte gezeigt werden, daß Ceramid-induzierte mitochondriale Aktivierung durch bcl-2-Überexpression verhindert werden kann. Um die Rolle der Ceramidase-Inhibitoren näher zu erklären, wurden für weitere Versuche bcl-2-überexprimierende Zellen eingesetzt. Wie in Abb. 11 gezeigt, verhindert Bcl-2-Überexpression vollständig die durch B13 induzierte Apoptose.



**Abb.11. Einfluss von Bcl-2 auf die B13-induzierte Apoptose.**

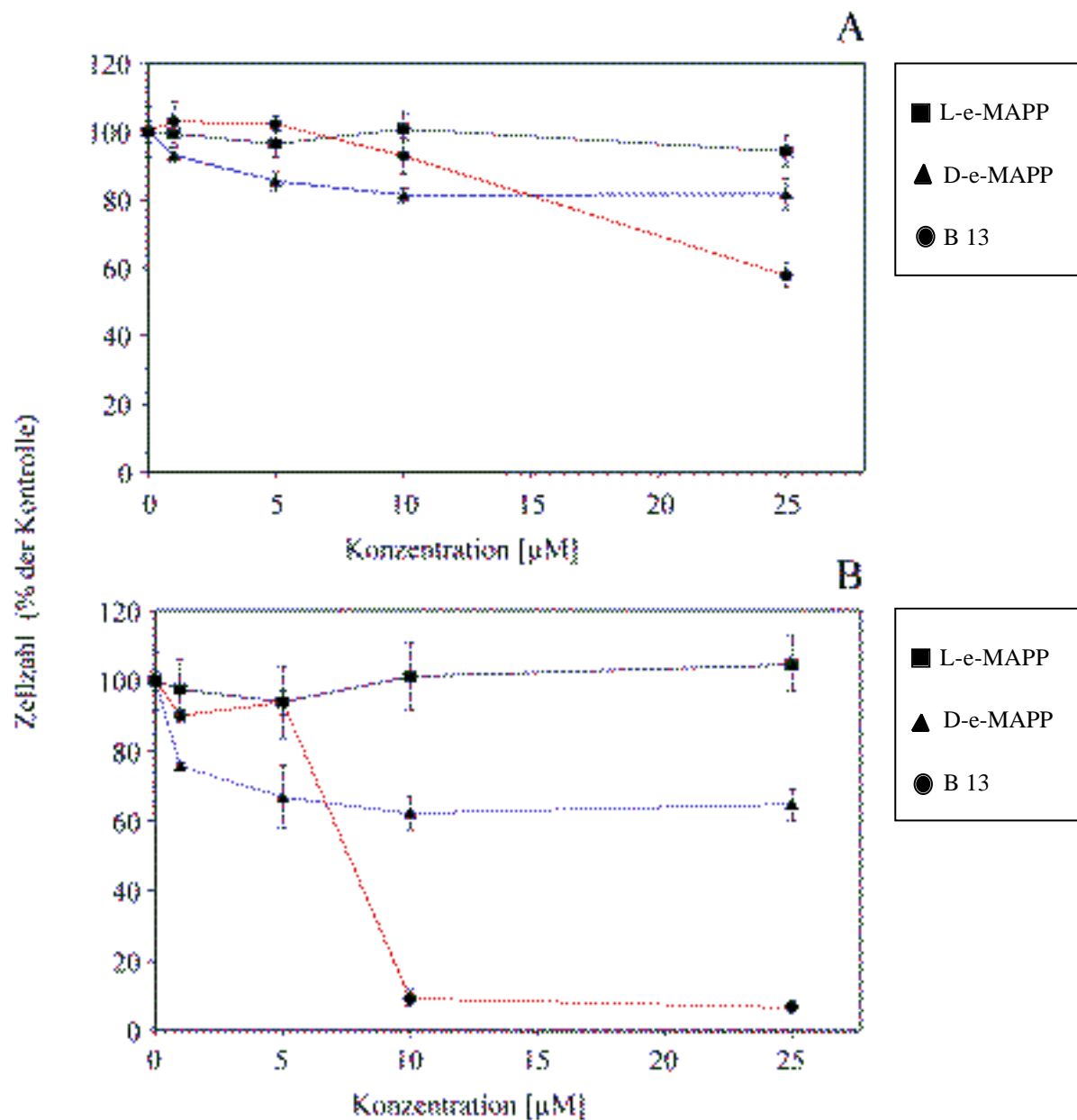
Bcl-2 transfizierte HaCaT-Keratinocyten und Vector-transfizierte Keratinocyten (Negativ-Kontrolle) wurden mit 25  $\mu$ M B 13 über 24 h behandelt. Wie im Methodenteil näher erläutert, wurde die apoptotische DNA-Fragmentation mittels eines „Cell Death Detection Elisa<sup>Plus</sup>“ zur Detektion von zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten photometrisch (405 nm) bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$ S.D. (n=4) angegeben.

#### 4.4. Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von HaCaT-Keratinocyten durch die Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13

In HaCaT-Keratinocyten und primären Keratinocyten konnte bereits gezeigt werden, daß einige Substanzen, wie Vitamin D-Abkömmlinge und synthetische kurzkettige Ceramide das Wachstum der Zellen hemmen (Geilen *et al.*, 1996; Bektas *et al.*, 1998). Andererseits wurde die Wirkung von L-e-MAPP und D-e-MAPP auf HL-60-Zellen untersucht, wobei zwar durch das D-Derivat eine Proliferationshemmung mit einem Verbleiben der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus resultierte, jedoch das L-Derivat ohne Effekt blieb (Bielawska *et al.*, 1996). In diesem Versuchsteil wurde die Wirkung von L -und D-e-MAPP sowie des neu synthetisierten Analogons B13 auf das Proliferationsverhalten von HaCaT-Keratinocyten untersucht. Ca. 30 % konfluente Zellen wurden über verschiedene Zeiträume behandelt und anschließend die Zellzahl indirekt mit der Kristallviolett-Methode bestimmt (s. Protokoll 3.5.). Dabei wurden wieder Zeit- (12 h, 24 h, 48 h, 72 h) als auch Konzentrationsabhängigkeit (0, 1, 5, 10, 25 µM) der Substanzen betrachtet. Abb. 12 A zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung der Derivate (0-25 µM) nach 24 h der Behandlung auf das Wachstumsverhalten der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dabei zeigt L-e-MAPP keine antiproliferative Potenz, während sowohl D-e-MAPP als auch B13 die Zellzahl signifikant vermindern: Schon 1 µM D-e-MAPP zeigt schwach antiproliferative Wirkung, bei 5 µM werden die Zellen auf 85 % der Kontrolle gehemmt, 10 µM und 25 µM hemmen die Zellen auf 81 % im Vergleich zur Kontrolle. B13 wirkt erst in einer Konzentration von 10 µM signifikant antiproliferativ und hemmt die Zellen auf 93 % im Vergleich zur Kontrolle. 25 µM B13 führt zu einer Verminderung der Zellzahl auf 58 % im Vergleich zu den Lösemittel-behandelten Zellen. Abb. 12 B zeigt die konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (0-25 µM) der 3 Substanzen auf HaCaT-Zellen nach 48 h Behandlungsdauer. Während L-e-MAPP auch hier ohne Effekt blieb, verstärkte sich die antiproliferative Wirkung von D-e-MAPP und B13 im Vergleich zu der 24-stündigen Behandlung. D-e-MAPP führte in einer Konzentration von 1 µM zu einer Zellwachstumshemmung auf 76 %, bei 5 µM auf 67 %, bei 10 µM und 25 µM auf 63 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. B13 führte in einer Konzentration von 1 µM und 5 µM zu einer Zellwachstumshemmung auf ca. 90 % der Kontrolle, während 10 µM bzw. 25 µM B13 zu



einer drastischen Proliferationshemmung auf 9 % bzw. 7 % im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Dabei liegt die entscheidende wachstumshemmende halbinhibitorische Konzentration von B13 bei 7,5  $\mu\text{M}$ . Weitere Inkubation aller Substanzen über längere Zeiträume (72 h) erbrachte keine signifikant stärkere Proliferationshemmung als nach 48 h. Nach 12 h Behandlungszeit konnte keine antiproliferative Wirkung der Phenylaminoalkohol-Derivate detektiert werden. Letztgenannte beiden Zeitpunkte wurden somit auch nicht graphisch dargestellt. Zusammenfassend ergibt sich, daß im Gegensatz zu dem wirkungslosen L-e-MAPP beide anderen Analoga antiproliferative Potenz besitzen. Diese entfaltet sich erst beginnend nach 24 h Inkubationszeit und verstärkt sich hin zu der längeren Behandlungszeit von 48 h, wobei weitere Behandlung keine signifikante Änderung mit sich bringt. Während D-e-MAPP eine maximale Wachstums-Inhibition von 40 % (bei 25  $\mu\text{M}$ ; 48 h Inkubation) initiiert, hemmt B13 die Zellen nahezu vollständig ( 10  $\mu\text{M}$ ; 48 h Inkubation).



**Abb.12. Konzentrations- und zeitabhängiger Effekt von L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten.**

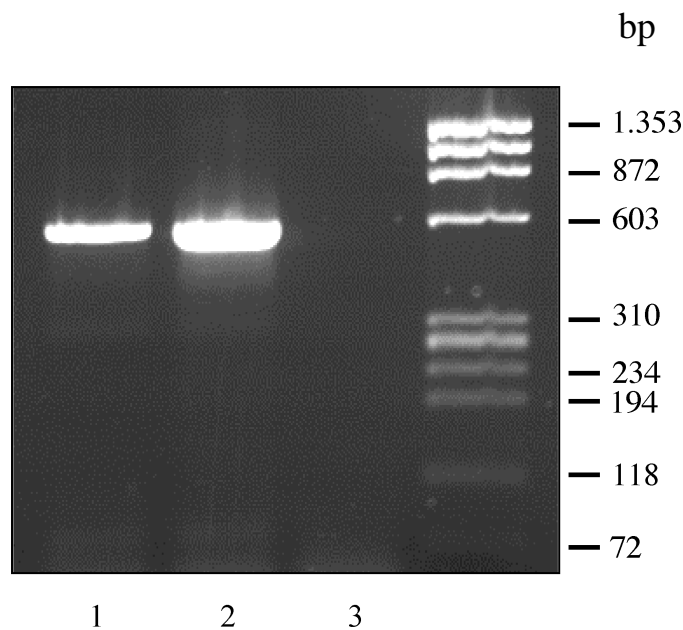
Semikonfluente HaCaT-Keratinocyten (30 %) wurden über verschiedene Zeiträume (A=24 h; B=48 h) mit variierenden Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$ ) der drei Substanzen behandelt. Die Zellproliferation wurde mittels der Kristallviolett-färbung zur quantitativen Bestimmung der vitalen Zellen ermittelt. Wie im Methodenteil näher erläutert wird die Zellzahl indirekt durch photometrische Messung bei 570 nm bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$ -S.D. (n=4) angegeben.

#### **4.5. Darstellung der sauren Ceramidase-Isoform in HaCaT-Keratinocyten mittels RT-PCR**

Während sich die zuvor beschriebenen Experimente der Frage nach möglichen biologischen Effekten der o.g. Substanzen in menschlichen Keratinocyten widmeten, sollte in den unter 4.5. bis 4.7. beschriebenen Experimenten auf die für diese Effekte verantwortlichen Faktoren bzw. biochemischen Prozesse eingegangen werden.

In HL-60 Zellen wurde das Vorkommen einer sauren und alkalischen Ceramidase-Isoform und die Hemmbarkeit der letzteren durch D-e-MAPP für dessen biologische Wirksamkeit im Gegensatz zum Ceramidase-unwirksamen L-e-MAPP verantwortlich gemacht. Eine neutrale Isoform (pH=7,0) wurde nicht detektiert (Bielawska *et al.*, 1996).

In menschlichen Keratinocyten wurde bislang noch keine Ceramidase-Isoform beschrieben. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war nur die saure Ceramidase in menschlichen Geweben näher charakterisiert, chromosomal lokalisiert und kloniert worden, was den Nachweis nur dieser Isoform mittels RT-PCR möglich machte. Die experimentellen Bedingungen, Primer-Sequenzen und Amplifikat-Länge sind in Kap. 2.5. und 3.10. näher erläutert. Als Positiv-Kontrolle diente die cDNA von HL-60 Zellen, deren saure Ceramidase-Aktivität, wie bereits erwähnt, bekannt ist. Wie die Abb. 13 zeigt, wird sowohl in HL-60 Zellen als auch HaCaT-Zellen die mRNA der sauren Ceramidase exprimiert. Obwohl keine eindeutige quantitative Aussage bezüglich der mRNA mit dieser Methode zu treffen ist, scheint nach Vergleich der Banden-Stärken die saure Ceramidase zumindest auf Gen-Ebene in HaCaT-Keratinocyten möglicherweise stärker exprimiert zu sein.



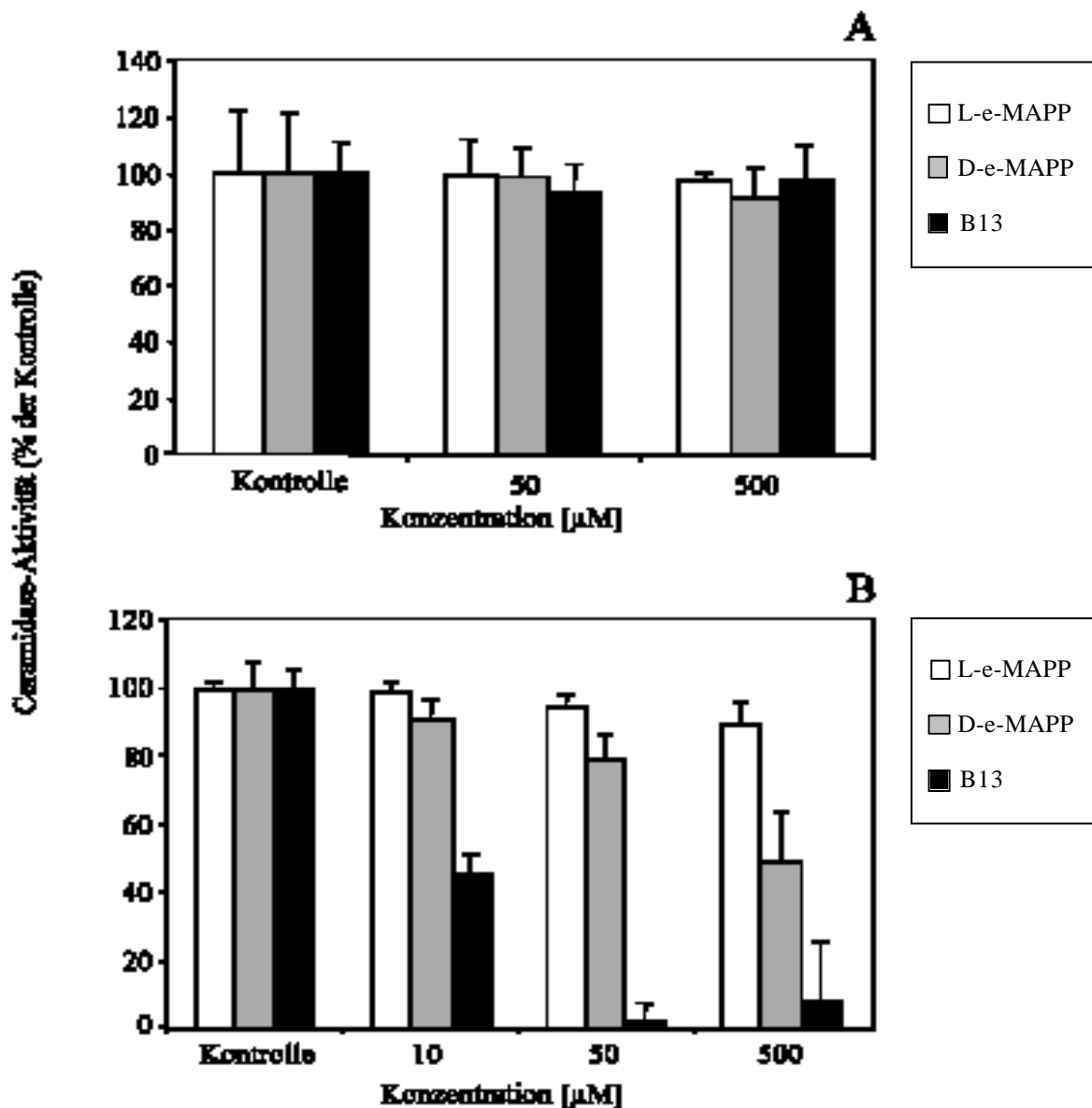
**Abb.13. RT-PCR der sauren Ceramidase in HaCaT-Keratinocyten.**

PCR-Bedingungen und Primer-Sequenzen sind in Protokoll 2.5. bzw. 3.10. beschrieben. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Zur Analyse und Dokumentation wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und in einem Transluminator photographiert. 1=HL-60-Zellen, Positivkontrolle; 2=HaCaT-Keratinocyten; 3=Wasser, Negativkontrolle. Zusätzlich aufgetragen ist der Basenpaarmarker mit nebenstehenden verschiedenen Produktlängen.

**4.6. Effekte der Phenylaminoalkohol-Derivate auf die Ceramidase-Isoformen in HaCaT-Keratinocyten**

In diesem Versuchsteil wurde überprüft, ob eine Aktivität der drei Isoformen der Ceramidase in menschlichen Keratinocyten zu messen ist und ob diese -ähnlich wie in HL-60 Zellen- durch die Phenylaminoalkohol-Derivate hemmbar sein könnten. Es wurden *in vitro*-Studien mit zytosolischen und Membran-Fractionen von HaCaT-Zellen durchgeführt. Die Ceramidase-Aktivität der Zell-Homogenate wurde wie in Kap. 3.8. beschrieben unter Beachtung der verschiedenen pH-Optima der Isoformen (pH=4,5, saure Isoform; pH=7,0, neutrale Isoform; pH=9,0, alkalische Isoform) bestimmt. Als Substrat wurde <sup>14</sup>C-markiertes C<sub>16</sub>-Ceramid eingesetzt. Nach Ablauf der Enzymreaktion (Spaltung von Ceramid in markierte Fettsäure und

nicht-markiertes Sphingosin-Rückgrat) wurde durch mehrere Phasentrennungen die Fettsäure separiert und konnte anschließend im Szintillationsgerät vermessen werden. Dabei wurde nicht die absolute Enzymaktivität bestimmt (pmol/mg/h), wie für die HL-60 Zellen beschrieben, sondern relative Werte der einzelnen Isoformen untereinander (in cpm) ermittelt. Während im neutralen pH-Bereich (pH=7,0) keine Enzymaktivität messbar war, konnten im sauren pH-Bereich (pH=4,5) und alkalischen pH-Bereich (pH=9,0) gute Enzymaktivitäten gemessen werden. Bei Einsatz gleicher Menge radioaktiven Substrates (s. Versuchsbeschreibung) konnte mit ca. 1500-2000 cpm in einer Probe bei saurem pH-Optimum eine 3-4fache Enzymaktivität gegenüber ca. 500 cpm im alkalischen Milieu gemessen werden. Schließlich wurde die Hemmbarkeit der alkalischen und sauren Ceramidase mittels der o.g. Substanzen bestimmt, wobei nicht behandelte Zellsolubilisate 100 %iger Enzymaktivität entsprachen und mit D-e-MAPP-, L-e-MAPP- und B13-behandelte Proben relativ in Prozent der Kontrolle angegeben wurden. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 50  $\mu$ M und 500  $\mu$ M, bei der sauren Isoform zusätzlich von 10  $\mu$ M zugegeben. Abb. 14 A zeigt die Beeinflussung der Analoga der alkalischen Ceramidase, Abb. 14 B stellt die Wirkung der 3 Substanzen auf die saure Ceramidase dar. Dabei zeigte L-e-MAPP keine Enzym-Hemmung im alkalischen pH-Bereich und eine 10 %ige Hemmung erst in einer 500  $\mu$ M Konzentration im sauren pH-Bereich. D-e-MAPP blieb ohne Wirkung auf die alkalische Ceramidase, scheint jedoch in HaCaT-Keratinocyten ein effizienterer Inhibitor der sauren Ceramidase-Aktivität als in HL-60 Zellen zu sein. 10  $\mu$ M D-e-MAPP bewirkte eine Hemmung auf 90 %, 50  $\mu$ M auf 80 %, 500  $\mu$ M auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle ( $IC_{50}$ =500  $\mu$ M). B13 bewirkte keine signifikante Hemmung im alkalischen pH-Bereich, war jedoch der effektivste Hemmstoff der sauren Ceramidase. Während 10  $\mu$ M eine Hemmung der Enzymaktivität auf 46 % bewirkte, führten höhere Konzentrationen von 50  $\mu$ M und 500  $\mu$ M B13 zu einer nahezu vollständigen Suppression der Enzymaktivität auf <10 % der Ausgangsaktivität.



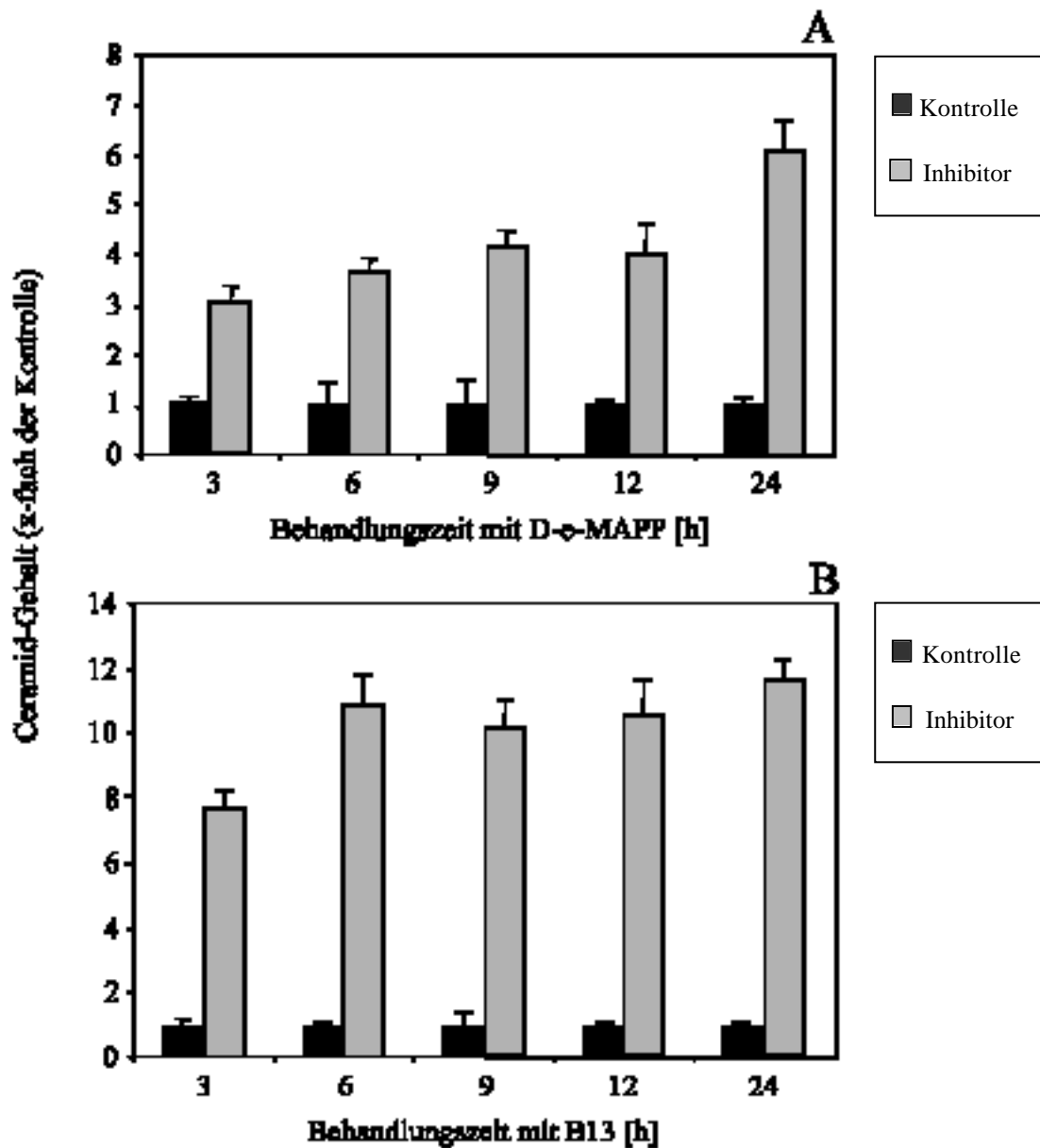
**Abb.14. Beeinflussung der alkalischen (A) und sauren (B) Isoform der Ceramidase durch L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 in HaCaT-Keratinocyten.**

Es wurden zytosolische als auch Membran-Fractionen von HaCaT-Keratinocyten auf ihre Aktivität der verschiedenen Ceramidase-Isoformen hin untersucht. Wie im Methodenteil näher erläutert, wurden Zellsolubilisate mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem  $\text{C}_{16}$ -Ceramid als Substrat versetzt, wobei die pH-Abhängigkeit der Isoformen (pH=4,5, saure Ceramidase; pH=9,0, alkalische Ceramidase) beachtet wurde. Unterschiedliche Konzentrationen von L-e-MAPP, D-e-MAPP oder B13 wurden dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die entstehenden Produkte (radioaktiv markierte Fettsäure und nicht-markiertes Sphingosin) durch mehrfache Phasentrennung extrahiert und die Aktivität der radioaktiven Proben in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Werte sind in Prozent der Kontrolle  $\pm$ S.D. (n=4) angegeben.

#### **4.7. Beeinflussung des intrazellulären Ceramid-Spiegels durch die Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13**

Ausgehend von der Tatsache, daß die o.g. Derivate z.T. die Ceramidase als eines der hauptsächlichen Ceramid-abbauenden Enzyme hemmen, müßte nach Behandlung der Zellen mit den sog. Ceramidase-Inhibitoren ein Anstieg des endogenen Ceramid-Spiegels zu detektieren sein.

Wie in Kap. 3.9. beschrieben, wurden HaCaT-Keratinocyten über 24 h mit L-[<sup>3</sup>H]-Serin-haltigem Medium versetzt und die so metabolisch markierten Zellen mit den Ceramidase-Inhibitoren über die verschiedenen Zeiträume (3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h) inkubiert. Nach anschließender Lipid-Extraktion wurden die Proben auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und entwickelt, für einige Tage mit einer Tritium-sensitiven PhosphoImager-Platte abgedeckt und die Banden anschließend mittels eines PhosphoImager radioaktiv quantifiziert. Dabei zeigte 25 µM L-e-MAPP keinen signifikante Induktion des Ceramid-Gehalts (Daten sind nicht graphisch dargestellt.). Wie in Abb. 15 gezeigt, führten 25 µM D-e-MAPP (Abb. 15 A) und 25 µM B13 (Abb. 15 B) zu einer zeitabhängigen Akkumulation des endogenen Ceramid-Pools. Während D-e-MAPP schon nach 3 h zu einem 3fachen Ceramid-Anstieg (300 %) im Vergleich zur Kontrolle führte, wurden nach 6 h Werte von 367 %, nach 9 h und 12 h von ca. 410 %, nach 24 h von 609 % erreicht. Die Behandlung mit B13 führte nach 3 h zu einem Ceramid-Anstieg auf 770 % im Vergleich zur Kontrolle, nach 6 h, 9 h, 12 h wurden mehr als 1000 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht, auch eine 24 h-Inkubation brachte nur geringe zelluläre Ceramiderhöhungen auf max. 1160 % der Kontrolle. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß L-e-MAPP im Gegensatz zu D-e-MAPP und B13 keinen intrazellulären Ceramid-Anstieg initiiert. D-e-MAPP führt schon nach 3 h Behandlung zu einem deutlichen Ceramid-Anstieg, welcher einen eher kontinuierlichen zeitabhängigen Verlauf aufweist und nach 24 h das Maximum von >600 % der Kontrolle beträgt. B13 führt vergleichsweise zu einer stärkeren Ceramid-Gehalt-Erhöhung von max. 1160 % der Kontrolle nach 24 h, wobei sich schon in den frühen Zeiträumen (0-6 h) die hauptsächliche Veränderung vollzieht.



**Abb.15. Zeitabhängige Beeinflussung des intrazellulären Ceramid-Spiegels durch D- $\alpha$ -MAPP (A) und B13 (B) in HaCaT-Keratinocyten.**

HaCaT-Keratinocyten wurden 24 h mit L-[ $^3$ H]-Serin-haltigem Medium inkubiert. Wie im Methodenteil näher erläutert, erfolgte anschließend eine Behandlung der Zellen mit den gewünschten Substanzen. Nach 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h und 24 h Behandlungsdauer wurden die Zellen geerntet, die Lipide nach der Methode von *Bligh und Dyer* extrahiert und mittels dünnschichtchromatographischer Auftrennung separiert. Die TLC-Platte wurde 5 Tage mit einer Tritium-sensitiven PhosphoImager-Platte bedeckt, anschließend im PhosphoImager eingelesen und der Ceramid-Gehalt über quantitative Auswertung der radioaktiven Banden bestimmt. Die Werte sind als x-fach der Kontrolle  $\pm$ -S.D. (n=4) angegeben.